

FACULTAD DE CIENCIAS

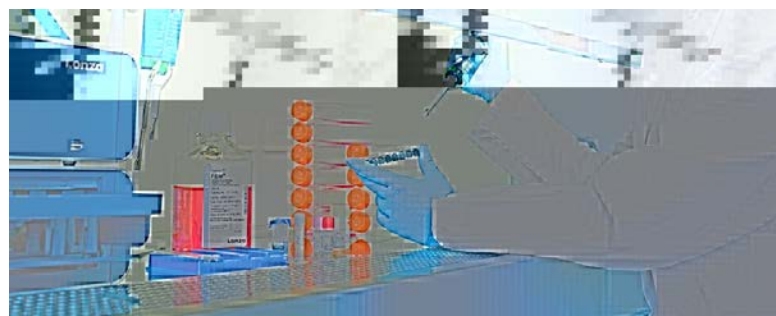
MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA AVANZADA

**DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS OPERACIONALES NECESARIOS
EN EL EMPAQUETADO DE COLUMNAS DE CROMATOGRAFÍA**

**DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS OPERACIONAIS NECESARIOS
NO EMPAQUEADO DE COLUMNAS DE CROMATOGRAFÍA**

**DETERMINATION OF THE OPERATIONAL PARAMETERS NEEDED
DURING THE PACKING OF CHROMATOGRAPHY COLUMNS**

TRABAJO FIN DE MÁSTER



AUTORA: BELÉN PATIÑO DOMÍNGUEZ

CONVOCATORIA: FEBRERO 2016



- ❖ **Nombre del alumno:** Belén Patiño Domínguez

- ❖ **Facultad en la que presenta:** Facultad de Biología, Universidad de A Coruña.

- ❖ **Nombre de la empresa donde se ha realizado el proyecto:** Lonza Biologics Porriño

- ❖ **Título del proyecto:**
 - Determinación de parámetros operacionales necesarios en el empaquetado de columnas de cromatografía
 - Determination of the operational parameters needed during the packing of chromatography columns
 - Determinación de parámetros operacionais necesarios no empaquetado de columnas de cromatografías.

- ❖ **Autorización (VB) de Tutor:**

- ❖ **Lugar, mes y año:** Ourense, a 26 de Enero de 2016.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	7
1. ANTICUERPOS MONOCLONALES (mAC).....	7
1.1. INTRODUCCIÓN	7
1.2. PRODUCCIÓN DE AC MONOCLONALES: Hibridomas	9
1.3. APLICACIONES.	10
2. PROCESO INDUSTRIAL	12
2.1. DESARROLLO DEL PROCESO:	13
2.2. PROCESO INDUSTRIAL: UPSTREAM & DOWNSTREAM	13
3. PURIFICACIÓN	16
3.1. LA ESTRATEGIA DE LAS TRES FASES	16
4. CROMATOGRAFÍA	20
4.1. DEFINICIÓN:.....	20
4.2. APLICACIONES	22
4.3 TIPOS DE CROMATOGRAFÍA.....	23
5. EMPAQUETADO	28
1.1. EL EMPAQUETADO:	31
1. 2. PRINCIPIOS DEL EMPAQUETADO:	33
1.3. RELLENO DE LA COLUMNA Y LA PREPARACIÓN	34
OBJETIVOS.....	35
MATERIALES	38
MÉTODOS Y RESULTADOS.....	40
Método de la probeta para la determinación de concentración de resina (V/V). Definición y resultados.	40
Determinación de la correlación entre la concentración de resina (V/V) y (W/V). Definición y resultados.	47
CONCLUSIONES	56
BIBLIOGRAFÍA.....	57
Gráficas e ilustraciones:	60

INTRODUCCIÓN

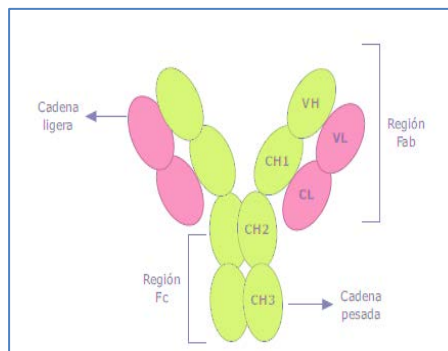
1. ANTICUERPOS MONOCLONALES (mAC)



1.1. INTRODUCCIÓN

Los anticuerpos monoclonales (mAC) son un tipo de proteína producida en laboratorio con el objetivo de unirse a sustancias del cuerpo, incluso a células cancerígenas (Figura 1).

Un anticuerpo es un tipo de proteína denominada Glicoproteína. Funciona como la parte específica del denominado complejo receptor de células B (BCR) reconociendo al antígeno a nivel de membrana de linfocito B, y como moléculas circulantes secretadas por las células plasmáticas procedentes de la activación, proliferación y diferenciación de células B.¹



Figural: Anticuerpo

Se trata de anticuerpos homogéneos producidos a partir de células híbridas, esto es, el producto de la fusión de un clon linfocito B descendiente de una única célula madre y una célula plasmática tumoral, denominado Hibridoma (Figura 2).²

Un mAC se elabora con la función de unirse a una única sustancia. Pueden utilizarse solos o como transporte de medicamentos, toxinas o material radioactivo directamente hasta la célula cancerígena.

Podría considerarse, por tanto, como un reactivo químico bien definido y reproducible. Su utilidad se debe a sus propiedades:

- Alta especificidad de unión
- Presentes en el organismo
- Heterogeneidad
- Capacidad de producción ilimitada
- Activación de los componentes del sistema inmune.

❖ Ventajas: son más baratos de producir. Identifican varios epítopos. En la técnica se emplean como AC secundarios: amplificación de la señal.

❖ Inconvenientes: distinta especificidad, mayor reactividad cruzada, diferencia entre lotes/muerte de animales.²

La producción de anticuerpos a partir de un único clon de células B, es decir monoclonales, no ha sido posible hasta el año 1975, año en el que se desarrolló la técnica de generación de hibridomas.

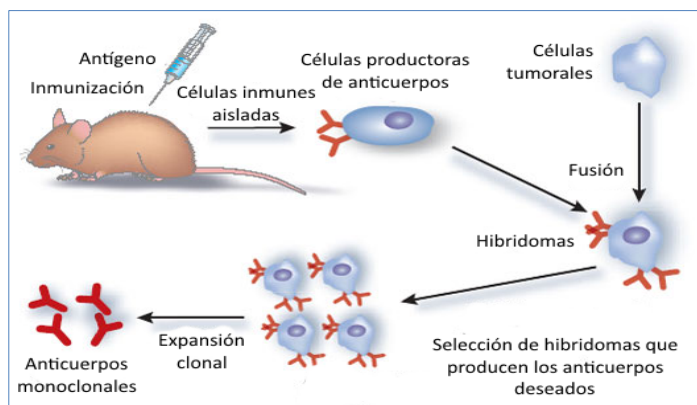


Figura 2: técnica de producción de hibridoma

1.2. PRODUCCIÓN DE AC MONOCLONALES: Hibridomas



Figura 3: Producción de hibridoma

Los anticuerpos son producidos por los linfocitos B en el organismo como respuesta a la entrada de un patógeno o sustancia extraña a él. Del mismo modo que ocurre en los seres humanos, los animales también combaten agentes externos produciendo anticuerpos en su sistema inmune.

George Köhler y Cesar Milstein en 1975 fueron los responsables del desarrollo de esta tecnología necesaria para la generación de anticuerpos monoclonales. Mediante esta técnica, es posible obtener poblaciones homogéneas de anticuerpos frente a un único antígeno. El primer paso necesario para la generación de hibridomas consiste en la inmunización de un animal (generalmente ratones roedores/murinos) con el antígeno de interés al que posteriormente se le han de extraer linfocitos B (Figura 3). Estas células productoras de anticuerpos contra el antígeno inyectado mueren tras pocos días en cultivo *in vitro*, de tal manera que para obtener una fuente continuada de anticuerpos, estas células B son fusionadas en presencia de polietilenglicol (PEG) con células tumorales que pueden crecer indefinidamente en cultivo celular (Figura 2). El PEG se emplea para disminuir la tensión superficial y asegurar la eficacia de la unión de las células. Tras seleccionar (en diversos medios de cultivo celular) los híbridos productores de los anticuerpos específicos frente al antígeno deseado, se cultivan para producir grandes cantidades del anticuerpo (Figura 2).

Estos híbridos se conocen con el nombre de **hibridomas**. Estas células fusionadas híbridas, pueden multiplicarse rápida e indefinidamente y producir gran cantidad de anticuerpos. Dado que las células que derivan de los hibridomas seleccionados proceden de una misma célula y por tanto son clones, los **anticuerpos** que se recuperan de estos cultivos son **monoclonales**.¹

1.3. APLICACIONES.

Hoy en día, y gracias a la producción industrial de mAC, han dejado de ser una curiosidad para convertirse en una forma de tratamiento y diagnóstico muy importante para muchas enfermedades. Existen más de 20 mAC aprobados por la FDA y en fase de ensayo clínico un número elevado (supone el 30% de todos los compuestos en investigación en el 2005)³ y más de 394 mAC en desarrollo preclínico y clínico.⁴

Los anticuerpos monoclonales aprobados hasta la fecha tienen aplicaciones terapéuticas en áreas tan diversas como terapia humana (enfermedades autoinmunes, pulmonares, cáncer o rechazo de trasplantes), investigación biomédica, diagnóstico y purificación.⁴

El cáncer abarca gran parte del mercado de anticuerpos monoclonales debido a que se han identificado numerosos antígenos que se sobreexpresan en las células tumorales.

En la figura 4, se muestra la comercialización de los anticuerpos monoclonales según su aplicación:

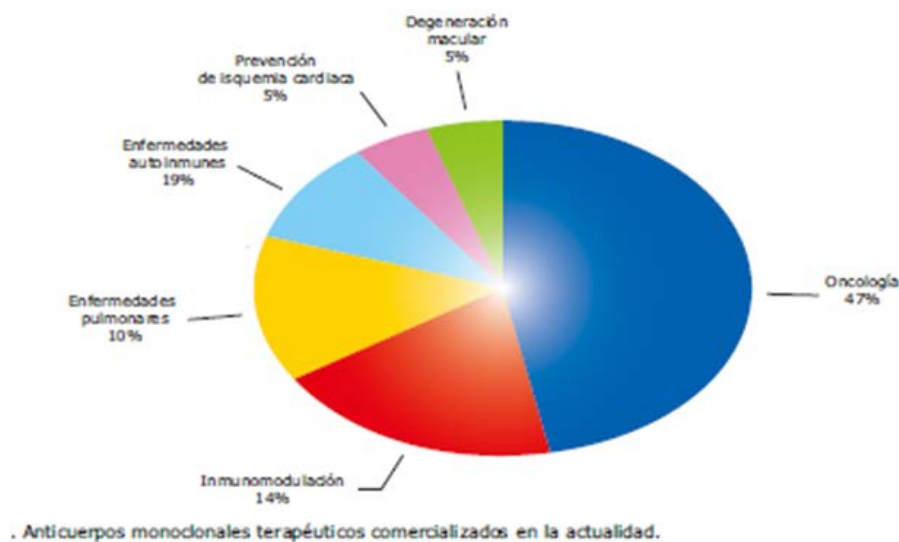


Figura 4: Aplicación de los anticuerpos monoclonales

Mediante la ingeniería genética, ha sido posible disminuir la inmunogenicidad que presentaban los mAC de origen murino mediante la humanización de los mismos. Esto consiste en el reemplazo al máximo posible de la molécula de ratón con porciones correspondientes de AC humano (Figura 5).

Esto sirve para que el sistema inmunitario no identifique al anticuerpo monoclonal como “forastero” y lo destruya antes de unirse a la proteína blanco. El primer mAC que fue comercializado fue Humira® (Adalimumab) en 2002.

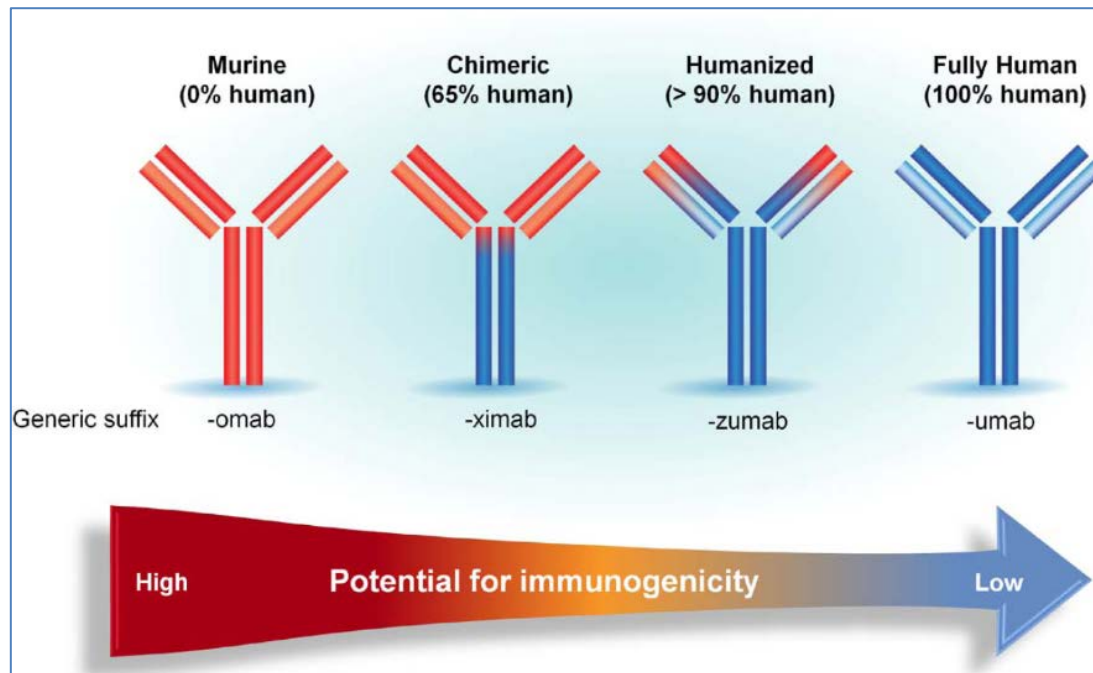


Figura 5: Potenciales de inmunogenicidad de los Anticuerpos

2. PROCESO INDUSTRIAL



Lonza Biologics Porriño (LBP) situada en O Porriño es la planta de producción de cultivos celulares que proporciona mayor capacidad de fabricación comercial y clínica de productos biofarmacéuticos en España. Es lo que se denomina una CMO: *Contract Manufacturing Company*.⁶

Se trata de una unidad de producción de productos biofarmacéuticos a la medida del cliente. Estos son empresas o centros de investigación con la necesidad de producir proteínas en cantidad y/o calidad superiores a su capacidad, así como compañías farmacéuticas que necesitan capacidad productiva adicional y flexible, tanto para productos en fase clínica como comercial.

El diagrama general del proceso industrial llevado a cabo para la mayoría de productos en Lonza sería el siguiente (Figura 6)⁶

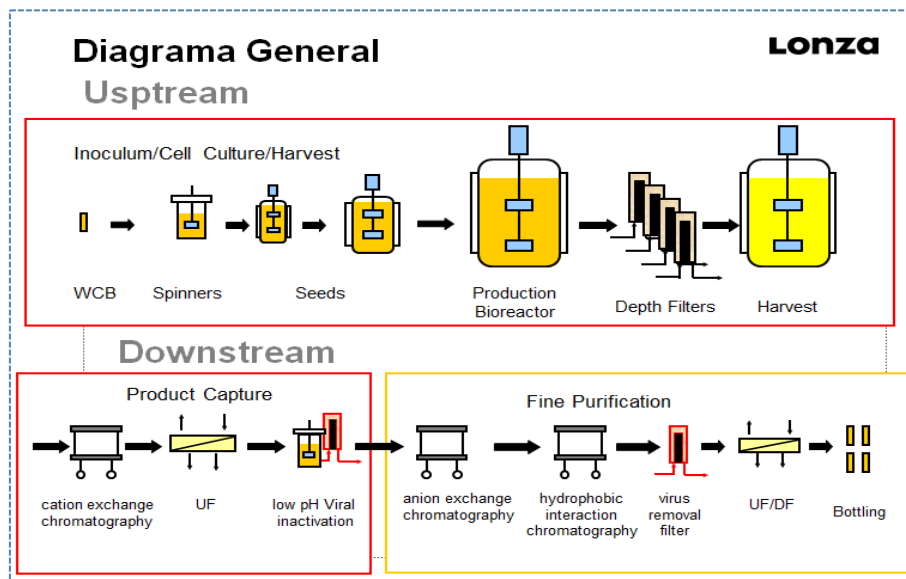


Figura 6: Esquema general del proceso industrial

2.1. DESARROLLO DEL PROCESO:

El desarrollo de un medicamento biofarmacéutico requiere, desde el principio, la purificación a escala de laboratorio para obtener material para la investigación y en las primeras fases de desarrollo.

Cuando se está desarrollando el protocolo de la primera purificación, debe tenerse en cuenta el escalado del proceso, a fin de evitar problemas en etapas posteriores, como pueden ser los métodos de separación, la capacidad de empaquetado de los medios de cromatografía y el coste global del proceso (Figura 7).⁷

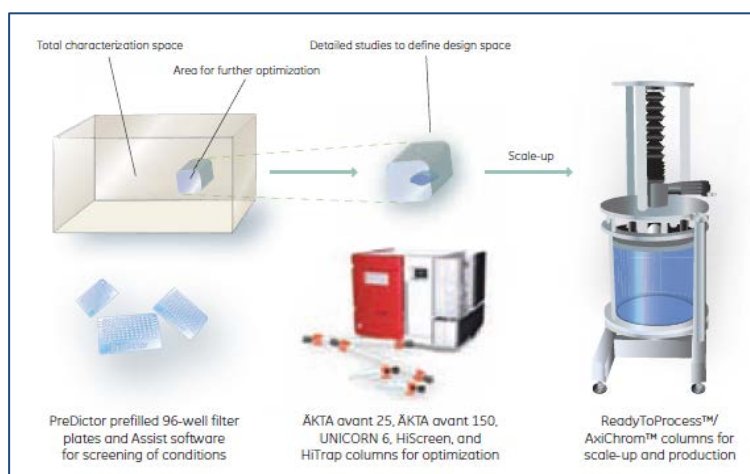


Figura 7: Escalado de producción biofarmacéutica

La elección de los medios adecuados de cromatografía debe hacerse en términos de estabilidad química y física, funcionalidad, reproducibilidad, tiempos de proceso cortos...⁸

2.2. PROCESO INDUSTRIAL: UPSTREAM & DOWNSTREAM

Para el desarrollo de anticuerpos, existen dos grandes áreas: cultivo de células (Upstream) y procesos de purificación (Downstream).

El proceso de Upstream incluye el desarrollo de línea celular, los medios de optimización y el proceso de cultivo de células.⁹

El proceso de Downstream comprende el *harvest* o centrifugación de células, captura de anticuerpos, la inactivación viral, y pasos de pulido.

El proceso **Upstream** comienza con la etapa de *seed train*, la cual conlleva a la descongelación de un vial de un banco de células de trabajo (WCB) congelado. Las líneas celulares más utilizadas para producir anticuerpos monoclonales a nivel industrial son las líneas a partir de células de hámster chino (CHO) o células de mieloma de ratón (NSO). El volumen de cultivo celular se va viendo aumentado para inocular el primer biorreactor (250 litros) donde las células continúan creciendo y el producto expresado se acumula en el caldo de cultivo (Figura 8). Los parámetros de control son el porcentaje de CO₂, flujo de gases, temperatura, pH y agitación. Un biorreactor es un tanque con agitación. Los cultivos son transferidos en fase exponencial al paso siguiente.⁹

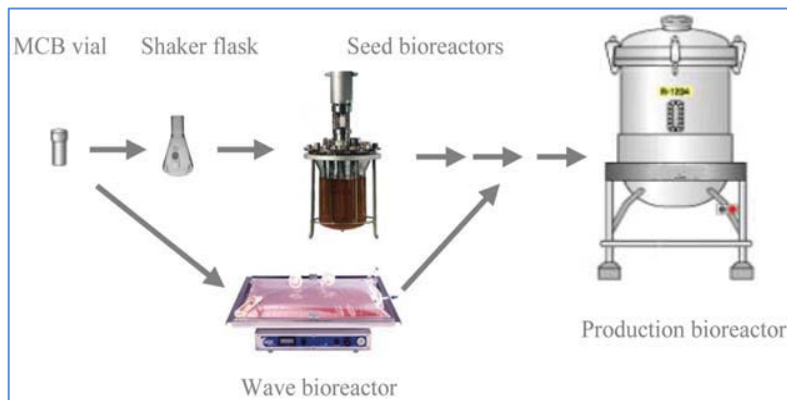


Figura 8: Etapa de Upstream a nivel industrial

La etapa intermedia entre *upstream* y *downstream* se denomina *harvest* o centrifugación. En esta etapa se separan los sólidos de los líquidos mediante centrifugación y filtración.

La etapa de **Downstream** es sinónimo de purificación. Los objetivos principales de un proceso de purificación son:

- ❖ Eliminar/reducir contaminantes: DNA, HCP y Proteína A
- ❖ Eliminar/reducir derivados del producto
- ❖ Agregados y formas del producto degradadas

❖ Eliminar virus

El rendimiento típico del proceso de purificación es de 60-80%. Suele ser la parte del proceso que requiere mayor inversión económica (Figura 9).⁹

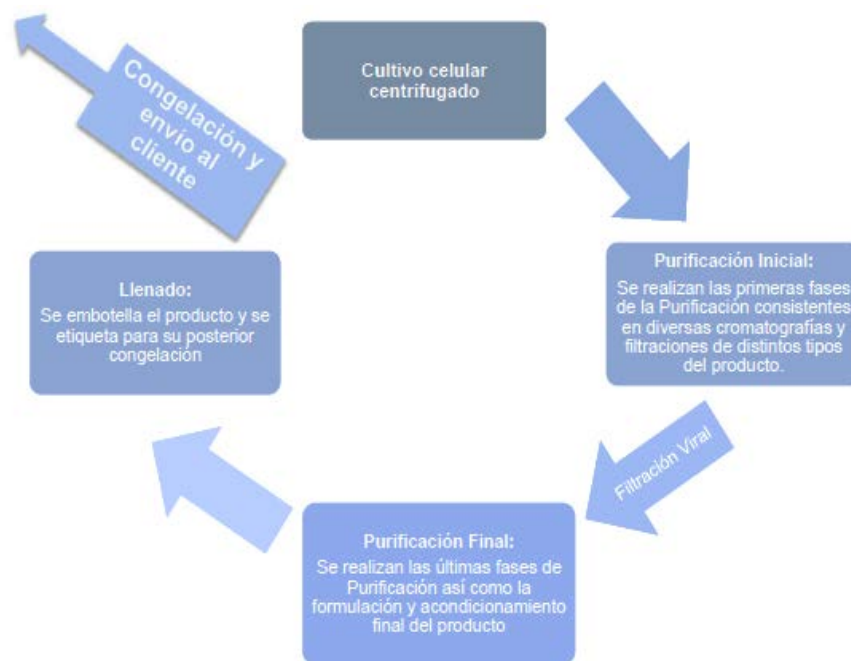
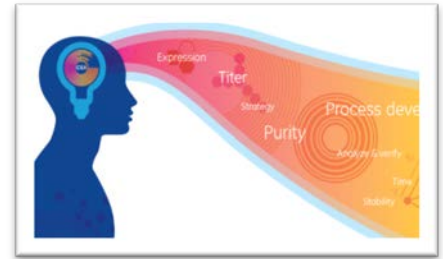


Figura 9: Pasos de un proceso industrial

3. PURIFICACIÓN

3.1. LA ESTRATEGIA DE LAS TRES FASES



Con la información obtenida hasta el momento, podemos aplicar la llamada Estrategia Trifásica (o de las tres fases) a ensayos y procedimientos de preparación de muestra.

Esta estrategia lleva asignado un objetivo específico para cada paso. Se utiliza como ayuda durante el desarrollo de procesos de purificación de proteínas terapéuticas en la Industria Farmacéutica y en esquemas de purificación a escala de laboratorio e investigación.

Por tanto, el objetivo de la etapa de purificación varía según en qué punto del proceso nos encontremos: al comienzo del aislamiento del producto de la muestra bruta, en el medio que se adiciona para purificar la muestra o al final de la limpieza del producto casi puro.

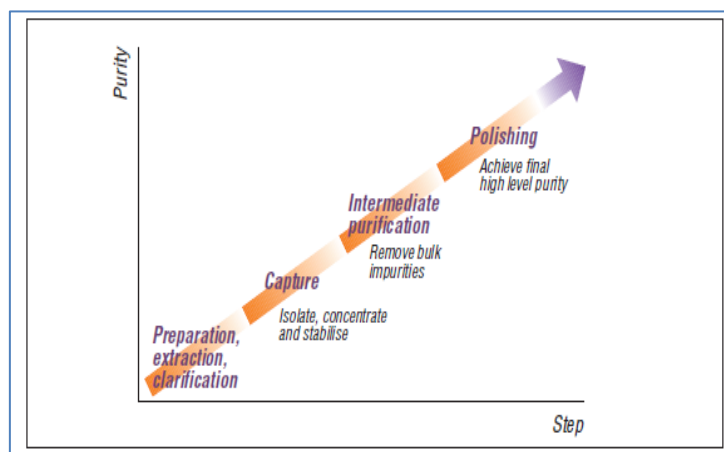


Figura 10: Estrategia Trifásica

La Estrategia Trifásica asegura el desarrollo de métodos más rápidos y económicos para conseguir el producto puro en menos tiempo.

La Estrategia Trifásica no tiene porqué constar de tres etapas definidas, ya que la purificación puede alcanzarse en un único paso. Para la purificación de proteínas

terapéuticas, puede ser obligatorio utilizar cuatro o cinco etapas de purificación con altas exigencias de pureza y seguridad.

Consta de tres fases (Figura 10):

1. Captura
2. Purificación intermedia
3. Pulido

Durante la fase de purificación intermedia, los objetivos son eliminar la mayor parte de las impurezas, tales como proteínas y ácidos nucleicos, endotoxinas y virus.

El objetivo final es alcanzar la pureza.

Las proteínas se purifican usando técnicas cromatográficas que separan según las diferencias en propiedades específicas.

PARÁMETROS

Para cualquier separación cromatográfica, cada técnica ofrecerá diferencias en el rendimiento con respecto a la recuperación, resolución, velocidad y capacidad. Una técnica se puede optimizar para centrarse en uno de los parámetros, por ejemplo, la resolución, o para lograr un mejor equilibrio entre dos parámetros, por ejemplo, la velocidad y capacidad.

Una separación optimizada para uno de estos parámetros producirá resultados bastante diferentes que los producidos utilizando la misma técnica, pero centrado en un parámetro alternativo.

La **capacidad** se refiere a la cantidad de proteína diana cargada durante la purificación.

La **velocidad** es la de mayor importancia al comienzo de la purificación, donde los contaminantes deben eliminarse rápidamente.

La **recuperación** cada vez es más importante debido al aumento de ingresos por aumento de cantidad del producto purificado. La recuperación está influenciada por procesos destructivos de muestra y las condiciones desfavorables en la columna.

La **resolución** se consigue mediante la selección de la técnica y la eficiencia de la matriz cromatográfica para producir picos estrechos. En general, la resolución es más difícil de lograr en las etapas finales de purificación, cuando las impurezas y la proteína objetivo tengan propiedades similares.¹¹

Según la etapa en la que nos encontremos y su objetivo, se tendrán en cuenta unos parámetros críticos y otros no (Tabla 1).

Tabla 1: Parámetros a tener en cuenta en función de la etapa

ETAPA	Características	PARÁMETROS			
		Capacidad	Velocidad	Resolución	Recuperación
Captura	Aislamiento Estabilización Concentración	x	x		
Purificación Intermedia	Purificación Concentración	x		x	
Pulido	Pureza final Evitar pérdida producto			x	x

1. **Etapas de captura**

La **captura** se refiere a la purificación inicial de la molécula diana o aclarado del material de origen. A menudo consiste en una separación del grupo utilizando una etapa de elución en el intercambio de iones o cromatografía de afinidad. Idealmente, también se consigue la eliminación de contaminantes críticos.¹¹

El objetivo de esta fase es aislar, concentrar y estabilizar el producto de manera eficiente mediante la optimización de la velocidad y la capacidad (Tabla 1). El producto se concentra y se transfiere a un entorno donde conserva la actividad y/o potencia.

Uno de los parámetros más críticos para optimizar y reducir la escala de trabajo será la capacidad de unión de la proteína en presencia de las impurezas.¹¹

Es importante tener en cuenta todos los aspectos: la extracción de la muestra y aclaración, capacidad de carga de la muestra, velocidad de flujo durante el equilibrado, encuadernación, lavado, elución y la limpieza, y la necesidad de procedimientos de limpieza en el lugar (CIP).¹¹

2. Purificación Intermedia

En la fase de purificación intermedia, el objetivo es separar la proteína diana de la mayoría de impurezas tales como otras proteínas, ácidos nucleicos, endotoxinas y virus. Esta etapa consiste en la eliminación de contaminantes a granel, con el objetivo de purificar y concentrar.

La velocidad es menos crítica en la purificación intermedia ya que las impurezas que causan proteólisis u otros efectos destructivos deberían haber sido eliminados, y el volumen de la muestra debería haberse reducido en la etapa de captura.

El equilibrio óptimo entre la capacidad y la resolución debe ser definido para cada aplicación específica. La técnica debe dar una separación de alta resolución. Generalmente, se necesitará gradiente continuo.¹¹

3. Etapa de pulido

En esta etapa se busca alcanzar la pureza final, mediante ajuste de pH, sales y aditivos necesarios para la conservación.

Son importantes las condiciones de recuperación y resolución (Tabla 1), para alcanzar la pureza final requerida y evitar la pérdida de producto.¹¹

4. CROMATOGRAFÍA

Para garantizar la seguridad de la producción de bioterapéuticos en células de mamífero es importante demostrar la eliminación de contaminantes virales potenciales en la etapa Downstream de purificación. Para ello, la etapa más importante es la cromatografía.

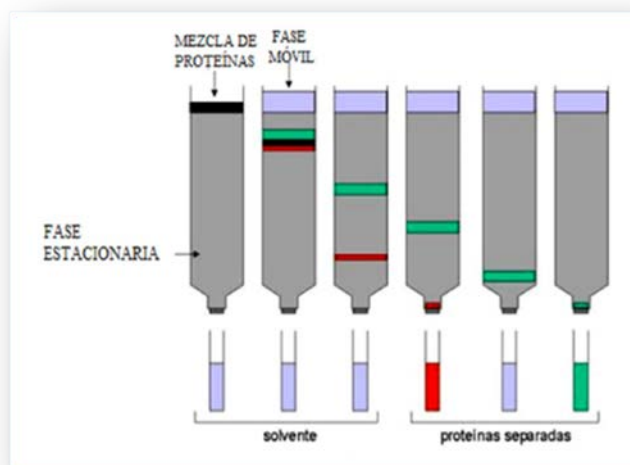


Figura 11: columnas de cromatografía

4.1. DEFINICIÓN:

Se trata de un método físico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil que se desplaza en una dirección definida, para la caracterización de mezclas complejas (Figura 11).¹¹

Es una técnica que se basa en hacer pasar la solución que contiene la proteína que se quiere purificar a través de una columna en la que se ha situado una matriz sólida porosa (resina) que está inmersa en un solvente. Los diferentes componentes van interaccionando con la matriz de acuerdo a su carga, hidrofobicidad, tamaño o capacidad específica de unirse a grupos químicos particulares según la matriz escogida.³

Las fases cromatográficas son dos:

❖ La fase móvil.

Fluye a través de una fase estacionaria, arrastrando con ella a los compuestos de la mezcla.

❖ La fase estacionaria.

En esta fase están retenidos los componentes de la muestra, y a través de ella fluyen la fase móvil arrastrando a los mismos.

Se basa en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar la cantidad de dichos componentes. Sutiles diferencias en el coeficiente de partición de los componentes dan como resultado una retención diferencial sobre la fase estacionaria y, por tanto, una separación efectiva en función de los tiempos de retención de cada componente de la mezcla.¹²

La cromatografía puede cumplir dos funciones básicas que no se excluyen mutuamente:

- Separar los componentes de la mezcla, para obtenerlos con una mayor pureza y que puedan ser usados posteriormente (etapa final de muchas síntesis).
- Medir la proporción de los componentes de la mezcla (finalidad analítica). En este caso, las cantidades de material empleadas suelen ser muy pequeñas.¹¹

La muestra se disuelve en una fase móvil, que puede ser un gas, líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria inmisible, la cual se mantiene fija en una columna o en una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria (Figura 12). Aquellos componentes que son retenidos con fuerza por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase

estacionaria se mueven más rápidamente con el flujo de fase móvil (=migración diferencial). Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente.¹²

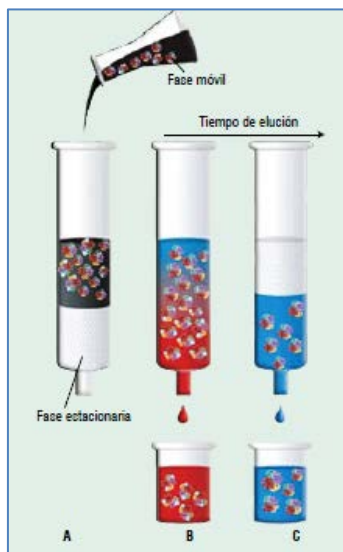


Figura 12: Fase móvil y fase estacionaria

4.2. APLICACIONES

Campos de aplicación:

- Fármacos: Antibióticos, sedantes esteroides, analgésicos.
- Bioquímica: Aminoácidos, proteínas, carbohidratos, lípidos.
- Productos de alimentación: edulcorantes artificiales, antioxidantes, aflatoxinas, aditivos.
- Productos de la industria química: Aromáticos condensados, tensoactivos, propulsores, colorantes.
- Contaminantes: fenoles, pesticidas, herbicidas, PCB.
- Química forense: Drogas, venenos, alcohol en sangre, narcóticos.
- Medicina clínica: ácidos biliares, metabolitos de drogas, extractos de orina, estrógenos.¹⁴

4.3 TIPOS DE CROMATOGRAFÍA

Las distintas técnicas cromatográficas se pueden dividir según cómo esté dispuesta la **fase estacionaria**:

- **Cromatografía plana.** La fase estacionaria se sitúa sobre una placa plana o sobre un papel. Las principales técnicas son:
 - *Cromatografía en papel*
 - *Cromatografía en capa fina*
- **Cromatografía en columna.** La fase estacionaria se sitúa dentro de una columna. Según el fluido empleado como fase móvil se distinguen:
 - *Cromatografía de líquidos*
 - *Cromatografía de gases*
 - *Cromatografía de fluidos supercríticos*¹⁵

A pesar del gran número de tipos de cromatografía distintos, vamos a centrarnos en tres de ellas, que son las que se han utilizado para llevar a cabo este trabajo:

1. Cromatografía de interacción hidrofóbica
2. Cromatografía de intercambio aniónico
3. Cromatografía de intercambio catiónico.

1. **Cromatografía de interacción hidrofóbica.**

La cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) separa y purifica biomoléculas en base a las diferencias de hidrofobicidad en su superficie.¹⁶

Muchas proteínas y péptidos, así como otras biomoléculas hidrófobas tienen un número suficiente de grupos hidrófobos expuestos para permitir la interacción con ligandos hidrofóbicos acoplados a matrices cromatográficas (Figura 13).¹⁷

En muchos casos, HIC resulta ser un método de separación ideal además de un proceso económico y estable. De hecho, ha aumentado su utilización de manera exponencial tanto en laboratorios como en procesos de producción industrial.¹⁸

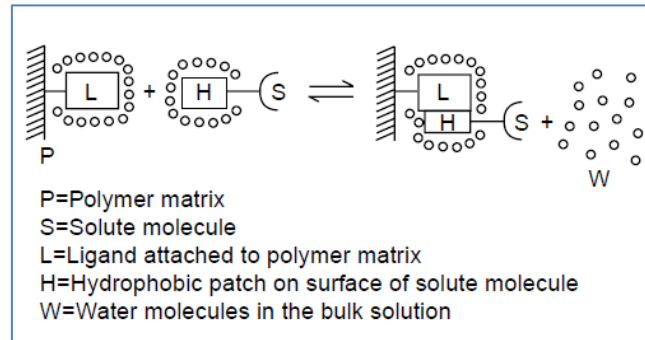


Figura 13: Cromatografía interacción hidrofóbica

En la *figura 13* puede verse la técnica que se lleva a cabo durante la cromatografía: cerca de la superficie del ligando hidrófobo y soluto (L y H) las moléculas de agua están más altamente ordenadas que en el agua a granel. La sal añadida interactúa fuertemente con las moléculas de agua dejando menos agua disponible, la cual es la fuerza motriz para que L y H puedan interactuar unos con otros.

Hay varios factores que influyen el comportamiento de proteínas y péptidos en soportes de HIC, como son las características de la muestra, caudal, temperatura, tipo y la concentración de sal, y el pH.

HIC suele ser una segunda o tercera etapa dentro del proceso de purificación de anticuerpos monoclonales debido a su capacidad para separar los anticuerpos monoméricos a partir de agregados y otras impurezas.¹⁸

2. Cromatografía de intercambio aniónico

La cromatografía de intercambio aniónico desempeña un papel importante en la mayoría de procesos de purificación de proteínas, ya que con este tipo de cromatografía se pueden obtener medios con una alta pureza y alta recuperaciones.¹⁹

El principio de esta cromatografía se basa en la unión de las partículas cargadas negativamente a la matriz sólida cargada positivamente, por lo que son retenidas (Figura 14). Las partículas cargadas positivamente son rechazadas por la matriz sólida, cargada positivamente, y son eluidas.

La elución de las partículas cargadas negativamente se consigue cambiando el pH del solvente hasta igualar su punto isoelectrico o hasta invertir su carga neta.²⁰

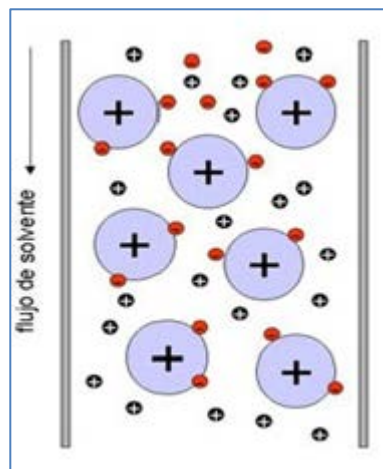


Figura 14: Cromatografía de intercambio aniónico

En general, se considera la cromatografía de intercambio aniónico un proceso robusto y con unos costes de operación razonables.

Al decidir utilizar este tipo de columna, es útil emplear entre uno y tres pasos para llevar a cabo la purificación de anticuerpos monoclonales debido a impurezas como el ADN, virus y proteínas de la célula huésped (HCP).

3. Cromatografía de Intercambio catiónico

El principio de esta cromatografía se basa en la unión de las partículas cargadas positivamente a la matriz sólida cargada negativamente, por lo que son retenidas (Figura 15). Las partículas cargadas negativamente son rechazadas por la matriz sólida, cargada negativamente, y son eluidas.

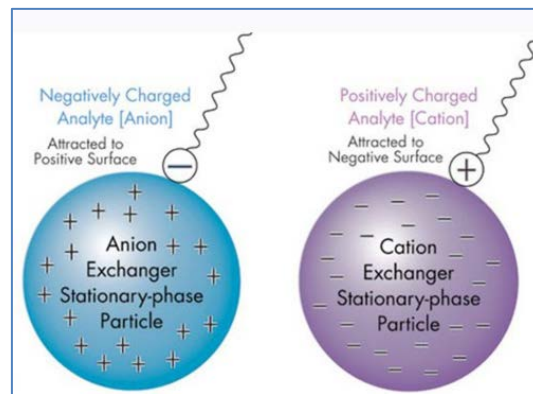


Figura 15: Diferencia entre Cromatografía de intercambio aniónico y catiónico

La seguridad viral es una gran preocupación para los fabricantes en la Industria Biofarmacéutica que utilizan células de mamíferos para llevar a cabo su producción, debido a que estas células son susceptibles a la contaminación por virus. Se ha comprobado que el empleo de cromatografías de intercambio catiónico (CEX) puede eliminar de manera efectiva y reproducible los virus. CEX es ampliamente utilizada en producción a gran escala debido a su alta capacidad de unión, alta selectividad para las impurezas, escalabilidad y robustez, además de su bajo coste.²⁰

Ambos tipos de cromatografía de intercambio iónico (IEC), aniónico y/o catiónico, son empleadas a gran escala o en la fabricación de productos biológicos.

Resumiendo:

Para evitar los cuellos de botella en la producción de anticuerpos monoclonales, cada paso tiene que ser optimizado. Un requisito previo es un equipamiento de última

generación para la planta. La detección de la correcta resina, así como los medios de separación que proporcionan todas las propiedades necesarias, son necesarios para capturar y purificar el anticuerpo con una alta recuperación en un corto período de tiempo.

Es posible llegar a un proceso robusto con sólo dos o tres etapas de cromatografía. Los efectos de diferentes parámetros del proceso tales como la pendiente, pH, velocidad de flujo y gradiente de carga de proteína en la pureza de los anticuerpos monoclonales, incluyendo la eliminación de ciertos contaminantes tienen que ser tenidos en cuenta.¹⁹

5. EMPAQUETADO

El empaquetado es el método de introducción de la resina en las columnas, de manera que la cromatografía tenga una distribución homogénea.

El proceso de empaquetado es uno de los procesos más importantes que acontecen en la purificación a gran escala. Durante todo momento de la producción de un determinado producto, en este caso mAC, es necesario que la resina esté correctamente empaquetada ya que de éste dependerá la eficacia y rendimiento de la columna y por tanto, de la etapa de purificación.

Para ello, influyen una serie de variables como son:

- Resina
- Empaquetado
- Análisis: Altura de plato teórico²²

1. Resina

La resina es seleccionada por su capacidad de separación de moléculas e impurezas, más que por cómo de bien se empaquete la columna con ellas. Se emplean muchos tipos de resina y todas tienen características individuales de empaquetado.

- Resina “soft”: se añade un 20-30% más de resina.
- Resina “semi-rígida” (sílice): sólo requiere un 5-15% más para alcanzar el volumen requerido tras la administración de presión. Las resinas de sílice se pueden utilizar con columnas de presiones extremas.
- Concentración de la resina: la resina puede ser empaquetada de manera diferente al cargarse la columna con distinta concentración de resina. Una concentración de resina que vaya bien para una columna no significa que ocurra lo mismo en una columna distinta.

La concentración de la resina es la variable más importante dentro del proceso de empaquetado, por ello se ha decidido llevar a cabo una serie de experimentos recogidos en la parte experimental de este trabajo.

2. Empaquetado de la columna.

Las columnas tradicionales permiten la reproducibilidad del empaquetado. Una vez que la técnica se determina, el empaquetado va a ser más efectivo. La cama que se puede expandir es la manera más sencilla a la hora de empaquetar, sin embargo necesita una mayor supervisión durante el proceso de producción.

Idealmente, todas las resinas deberían estar definidas antes del empaquetado, eliminándose todos los pequeños fragmentos que podrían haberse generado.

La fase móvil juega un importante papel a la hora de empaquetar. Generalmente se prefiere que el medio/solvente empleado sea lo más estrecho posible.

3. Análisis: Altura del plato teórico (HETP)

Una vez que la columna está empaquetada, una serie de análisis nos darán la cualificación y estado de la columna. El resultado de estas pruebas no puede predecir el éxito en el paso de la cromatografía, pero son muy útiles a la hora de reproducir el empaquetado de la columna, ya que sus valores dan la eficiencia de la columna.²²

El más importante de estos análisis se denomina Altura de Plato Teórico (HETP), que consiste en hacer pasar a través de la columna dos soluciones de ensayo distintas mientras que se monitoriza la conductividad para crear un pico de elución y una curva sobre un gráfico (Figura 16). Este gráfico es analizado para determinar la calidad del empaquetado de la columna: un cambio en la forma del pico, que aparezca antes o después de lo previsto, etc. significaría un incorrecto funcionamiento de la columna. Para los análisis de columna estándar se emplea una molécula sonda, como puede ser acetona o PABA (ácido p-aminobenzoico).²²

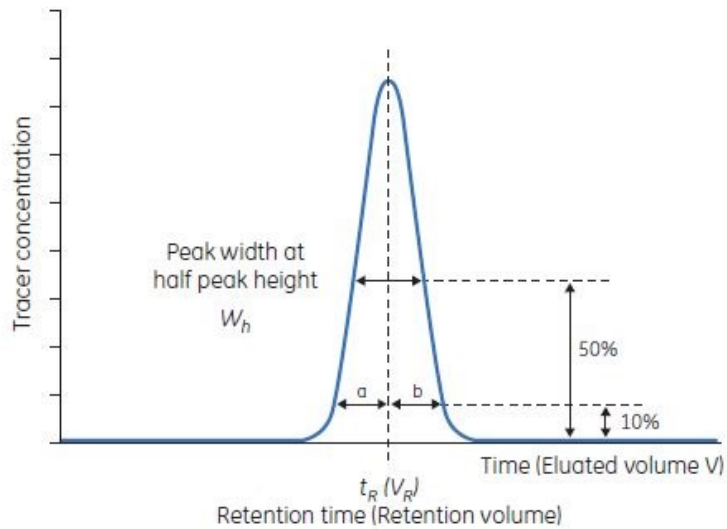


Figura 16: Pico resultante de prueba HETP

Posibles causas de un valor de análisis alto o bajo:

ALTO

El inyector está lejos de la columna

La columna no ha sido empaquetada eficazmente

BAJO

Es probable que haya una molécula retenida en la columna debido a la interacción con el grupo funcional

Cada columna contiene una resina específica, a la que se ligará el componente que funciona como agente ligando bajo condiciones específicas. Las resinas solo pueden captar una determinada cantidad de componente hasta que está totalmente saturada. En este punto, no es posible que se una nada más a la resina hasta que los componentes ligados sean eluidos de la columna (son arrastrados por el tampón de elución).

La eficacia y rendimiento de la columna van a depender de la resina y de su correcto empaquetado. En la columna se introduce un volumen determinado de resina mezclada con tampón de empaquetado. Este volumen debe ser el máximo de la capacidad de la

columna y su distribución, uniforme. Por lo que es muy importante determinar previamente la concentración de resina que llevará dicho volumen.

Una mala operación de empaquetado de la columna puede hacer que la distribución de la solución que contiene la proteína no sea uniforme, lo que conduciría a una saturación de la resina en algunas zonas y poca o ninguna unión de la proteína a la resina en otras zonas. Por tanto, se perderá gran parte de la proteína y la que se recupere probablemente no tendrá la pureza adecuada.²⁴

1.1. EL EMPAQUETADO:

Para empaquetar la resina en la columna, es necesario que la resina esté resuspendida en tampón de empaquetado dentro de un tanque. Esta mezcla de resina y tampón se denomina *slurry* y se prepara en un tanque específico (Figura 17).

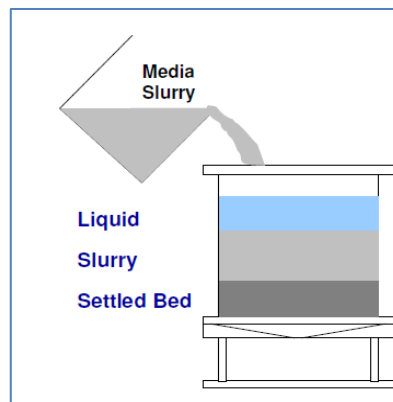


Figura 17: Ilustración del proceso de empaquetado a escala industrial

El proceso de empaquetado se lleva a cabo mediante lo que se denomina un *skid de empaquetado*, constituido por dos bombas neumáticas de pistón: bomba de empaquetado y de desempaquetado (Figura 18). Se diferencia por el sentido del flujo.

Este skid de empaquetado se utiliza para introducir el *slurry* en la columna (Figura 19). Este equipo puede utilizarse posteriormente para llevar a cabo las pruebas que confirmen el correcto empaquetado de las columnas (HETP).²²



Figura 18: Skid de empaquetado de GE Healthcare



Figura 19: Skid de cromatografía unido a una columna de cromatografía

En una columna bien empaquetada, la densidad de la resina una vez empaquetada debe ser homogénea con un volumen intersticial controlado, esto es, el espacio entre partículas.²

Las técnicas comunes de empaquetado son las siguientes:

- Compresión dinámica axial (DAC)
 - Se consigue mediante la compresión axial de los medios en suspensión.

- Flow packing / empaquetado mediante flujo
 - Utiliza presiones constantes y velocidad de flujo
- Stall packing
 - Empaquetado mediante bombeo del medio en la columna a través de boquillas.²⁴

Algunos de los factores que puedan influir a la hora de empaquetar la columna:

- Naturaleza de la resina
- Compresión
- Fase móvil
- Concentración de slurry
- Re-slurry
- Tiempo de sedimentación del slurry
- Velocidad de flujo del empaquetado

Los diferentes componentes de la disolución pueden interaccionar con la resina de acuerdo a su carga, hidrofobicidad, tamaño o capacidad específica de unirse a grupos químicos particulares, en función de la resina utilizada.²⁴

1. 2. PRINCIPIOS DEL EMPAQUETADO:

- Manejar con cuidado la resina (especialmente durante la preparación de la resina)
- Trabajar rápido (para evitar la sedimentación)
- Utilizar concentraciones de slurry 70%
- Evitar la entrada de aire
- Evitar la fluctuación de la temperatura²⁴

El empleo de una columna que no sea la adecuada puede comprometer a toda una campaña de producción a nivel industrial, debido a que cada ciclo de cromatografía deberá pasar a través de la columna.

1.3.RELLENO DE LA COLUMNA Y LA PREPARACIÓN

El relleno eficiente de la columna es esencial para una buena separación, especialmente cuando se utilizan gradientes de elución. Una columna mal empaquetada da lugar a un mal y desigual flujo, ensanchamiento de picos y pérdida de la resolución.

Si se requiere relleno de la columna, se aplicarán las siguientes directrices en todas las escalas de funcionamiento:

- Cuando se utiliza una técnica de unión, utilizar columnas cortas y anchas (típicamente de 5 a 20 cm de altura de la cama) para la purificación rápida, incluso con flujo lineal bajo.
- La cantidad requerida de medio de cromatografía dependerá de la capacidad de unión del medio y la cantidad de muestra. La capacidad de unión está siempre significativamente influenciada por la naturaleza de la muestra, así como el propio medio y debe ser determinada empíricamente. Estimar la cantidad de medio necesario para “obligar” a la muestra de interés y utilizar cinco veces esta cantidad para empaquetar la columna. La cantidad requerida puede reducirse si la resolución es satisfactoria.
- Una vez que se han determinado los parámetros de separación, escalar una purificación mediante el aumento del diámetro de la columna para aumentar el volumen de la columna. Evitar el aumento de la longitud de la columna, ya que va a alterar las condiciones de separación.⁷

OBJETIVOS:

Como se ha ido comentando a lo largo de este trabajo, en la purificación de anticuerpos monoclonales el paso más importante es la cromatografía. Para llevar a cabo de manera eficiente esta etapa, el empaquetado de la columna ha de efectuarse correctamente.

La columna de cromatografía se empaqueta con un volumen de *slurry* determinado: una cantidad de resina que se resuspenderá en un volumen de tampón de empaquetado.

La concentración de resina con la que empaquetar la columna es por tanto crucial en el desarrollo total del proceso industrial de purificación.

Esta concentración de la resina se lleva a cabo mediante el empleo de métodos propios en la planta de Lonza. Antiguamente, se empleaba el método denominado PD-10 pero, actualmente, se ha introducido un nuevo método con el que determinar la concentración de la resina de manera eficiente y reproducible a todas las producciones para un producto en concreto. Este nuevo método consiste en llevar a cabo un experimento en laboratorio con las mismas condiciones que las llevadas en planta, siguiendo para ello dos protocolos o métodos (se explicarán en el apartado de métodos):

- **Método Gravimétrico:** *Método de la probeta para la determinación de concentración de resina (V/V).*
- **Método Centrífuga:** *Determinación de la correlación entre la concentración de resina (V/V) y (W/V) durante la cromatografía.*

Se nos presenta un producto de fabricación anual en la planta de Lonza desde hace un tiempo, de los más antiguos que se producen en la misma, el cual sigue utilizando el antiguo método de determinación de concentración de resinas: PD-10.

MÉTODO PD-10:

El método PD10 consiste en preparar una jeringa de 10 mL introduciéndole un filtro en su parte inferior humectado con IPA (alcohol a un determinado porcentaje). En esta jeringa se introducen 10 mL de slurry pipeteados, se coloca en vertical y se permite que drene el tampón a través del filtro inferior por un tiempo determinado. Pasado este tiempo, se procede a leer el volumen que ocupa la resina en la jeringa (Figura 20).



Figura 20: Método PD-10: Decantación de la resina

Este método presenta los siguientes inconvenientes:

- Mientras se pipetea, la resina tiene a decantar variando la concentración inicial de la jeringa.
- Una vez dentro de la pipeta, la resina también tiende a decantar si no se enrasa rápidamente con el slurry.
- La escala de la jeringa es de 0.2 mL, por lo que existe cierta incertidumbre al leer el volumen entre las dos marcas.
- Algunos tipos de resina seguirían drenando tras pasado el tiempo establecido.
- Un elevado consumo de tiempo: desde un mínimo de treinta minutos a un máximo de 120 minutos, según la resina.

- Las jeringas no tienen la exactitud requerida de un instrumento de medición.

Por todos estos motivos, se decide actualizar los datos obtenidos hasta ahora mediante el método PD-10 y sustituirlos mediante la ejecución de los métodos antes mencionados: Métodos de sedimentación y centrífuga.

De esta manera, se busca obtener datos de la concentración de resina con cierta exactitud para el correcto empaquetado de las columnas de este producto en concreto.

Así que, el objetivo principal de este experimento es determinar los siguientes aspectos:

1. Si el método de Sedimentación/Centrifugación puede ser una alternativa al antiguo método PD-10.
2. Posibles mejoras en el empaquetado de la cromatografía de intercambio iónico y de interacción hidrofóbica.
3. Determinar el tiempo de sedimentación de resinas “difíciles”, como es el caso de la resina de cromatografía de interacción hidrofóbica.

MATERIALES

En el proceso de purificación del Anticuerpo Monoclonal a estudio presenta tres cromatografías con sus respectivas resinas: Dos cromatografías de intercambio iónico y una cromatografía de interacción hidrofóbica, que se describen a continuación;

- **Resina 1.** Se trata de una resina de cromatografía de intercambio catiónico (SO_3^-). El producto se une a la resina.
- **Resina 2.** Esta resina es utilizada en cromatografía de intercambio aniónico (NH_4^+). El producto fluye sin ser retenido.
- **Resina 3.** Esta resina tienen propiedades hidrofóbicas (cromatografía de interacción hidrofóbica). El producto queda retenido en la resina y es eluido aplicando un tampón con alta conductividad.

Los materiales necesarios son los siguientes:

1. **Muestras de las tres resinas:** Resina 1, Resina2 y Resina 3.

Un mínimo de 250 mL de resina para estudio, o lo equivalente en peso a 250 mL. Registrar

2. **Botella con filtro**

Botella con filtro para lavar las resinas con presión negativa, de Millipore®
Filtro necesario Millipore Express Plus® 0,22µm.

3. **Soluciones:**

En la descripción del proceso de purificación se indica cinco litros de solución de empaquetado y un litro de la solución de almacenado para la resina bajo estudio. La solución de empaquetado será preparada siguiendo las indicaciones correspondientes al protocolo de laboratorio (Laboratory Record LR), y será almacenada en una botella Pyrex®.

- Tampón de empaquetado

- Tampón de almacenamiento

Ambos tampones son soluciones de MilliQ Merck-Millipore®

4. Probetas

Cinco probetas graduadas de 100 mL y una probeta graduada de 1 litro para cada resina, esto es, quince probetas graduadas clase A de 100 mL y tres, de 1 Litro.

5. Tubos centrífuga

Para llevar a cabo la centrífuga, se necesitarán treinta tubos de centrífuga de 50 mL Eppendorf®, F2519-6, y treinta pipetas de 10 mL Pyrex®, ítem 0609241, para cada resina, esto es, noventa tubos y noventa pipetas.

6. Centrífuga

Se ha empleado la centrífuga de planta, para que los resultados puedan ser escalados. La centrífuga es: Eppendorf Centrifuge® 5804 rotor A-4-44 Max 5000 rpm, ID:214071/ FER-10034-002.

7. Balanza

Balanza de pesada analítica de planta, ubicada en la sala de cromatografía, con una resolución de 0,01 gramos.

8. Personal

Se requiere de dos operarios para llevar a cabo el método de sedimentación: una persona miembro del laboratorio de Lonza y una segunda, personal en prácticas (Belén Patiño).

En el método de centrífuga, al tener las mismas condiciones que las que se llevarán en el empaquetado en planta, se necesita un tercer operario miembro del equipo de producción.

De esta manera, pueden comprobarse los datos obtenidos y contar con el factor humano en cuanto a visualización de la sedimentación y pipeteado en la centrifugación.

MÉTODOS Y RESULTADOS

Los métodos que se van a llevar a cabo se ciñen a dos protocolos destinados y creados para la determinación de la concentración de resina durante la cromatografía. Se trata de una manera de poder analizar estos datos en laboratorio y escalarlos a planta mientras se realiza la purificación/cromatografía a escala industrial:

- **Método Gravimétrico:** *Método de la probeta para la determinación de concentración de resina (V/V).*
- **Método Centrífuga:** *Determinación de la correlación entre la concentración de resina (V/V) y (W/V) durante la cromatografía.*

1. MÉTODO GRAVIMÉTRICO

Método de la probeta para la determinación de concentración de resina (V/V).
Definición y resultados.

INTRODUCCIÓN

La cantidad de resina para empaquetar una columna es calculada basándose en el volumen de columna (CV) y el factor de compresión de la resina (CF). Para introducir la resina dentro de la columna ha de ser previamente resuspendida con solución de empaquetado para crear la resina *slurry*. El valor de la concentración de resina en *slurry* tiene un gran impacto en el éxito del empaquetado, por lo tanto, una determinación robusta y precisa de este valor es crítico para el procedimiento de empaquetar la columna.

La sedimentación por gravedad de la resina en la probeta graduada es el método de referencia y empleado como referencia para otros métodos. La muestra de *slurry* se introduce en estas probetas. La sedimentación por gravedad de la resina se lleva a cabo

en un tiempo de 24 horas en solución de empaquetado. Basándose en dicha sedimentación, se calcula la concentración de slurry (V/V).

Enjuague de la resina con solución de packing

Entre producción y producción, las resinas son almacenadas en el Almacén de la planta en una solución de empaquetado para evitar su deterioro.

Mediante un formulario entregado en el Almacén, las resinas a estudio llegaron al laboratorio. Por tanto para obtener la resina seca y conocer su peso, en primer lugar, se lava la resina eliminando la solución de almacenamiento empleando una botella con filtro (Figura 21) aplicando presión negativa.

La resina seca obtenida se enjuaga con solución de empaquetado tantas veces como sea necesario hasta recoger un volumen de solución equivalente a entre diez y doce veces el volumen de resina (Tabla 2).



Figura 21: Botella con filtro de Millipore

Tabla 2: Equivalencia volumen de resina seca / tampón empaquetado:

	RESINA 1	RESINA 2	RESINA 3
Cantidad de resina seca	200 mL	225 mL	200 mL
Cantidad de tampón de empaquetado para enjuagar	2 L	2.5 L	2 L

A la resina seca obtenida se le añade solución de empaquetado y se transfiere a una botella Pyrex® de un litro. El sobrenadante se elimina y es reemplazado por la solución de empaquetado hasta un volumen total de 2.2 veces la resina decantada. Se resuspende.

Preparación de las probetas:

Según los límites de proceso para este producto, la concentración óptima para estas resinas se encuentra entre el 40,0 y 50,0%. Es por esto que, con el objetivo de abarcar mayor cantidad de datos y por tanto, mayor exactitud, se van a preparar cinco probetas con cinco concentraciones de resina entre ambos valores: 42.0%, 42.5%, 45.0%, 47.5%, 50.0%.

Se deposita la resina en probetas graduadas de 100 ml y, posteriormente, se añade el tampón de empaquetado para alcanzar las cinco concentraciones de resina.

Se deja un tiempo aproximado de una hora para que ocurra la decantación en cada probeta y poder ver así la concentración de la resina. Si es necesario, añadir más tampón (Volumen máx. = 100 mL) hasta alcanzar el volumen requerido para conseguir la concentración previamente determinada. En el caso de la resina 3 (hidrófoba) se complica la precisión debido a las propiedades hidrofóbicas de esta resina, quedando suspendida en el tampón.

Las probetas se cierran con *film* para evitar evaporaciones, se resuspende la resina de cada una de ellas, y se puede empezar a contar el tiempo de sedimentación para cada una de las probetas (Figura 22).

Se dejan 24h, una vez homogeneizadas. No mover las probetas en este tiempo. (Y si es necesario, re-ajustar las probetas para alcanzar la concentración deseada). Cada operador deberá registrar estas medidas de volumen de slurry, y el volumen de sedimentación a cada tiempo.



Figura 22: Probetas graduadas a concentración 40-50%

Tras haber pasado 24 horas, se comprueba la concentración de cada probeta y, si fuese necesario, se ajustan con tampón de empaquetado.

Se procede a llevar a cabo el método de decantación por tiempo:

El volumen de la resina en el volumen total del tampón (o slurry, para ser más precisos) se mide “visualmente” cada 30 minutos durante un total de seis horas. En el momento que el volumen de decantación se haga constante, podemos decir que ese valor es el tiempo de decantación o sedimentación para cada una determinada resina. De todos modos, las probetas se dejaron 24 horas en total.

Una vez transcurridos las 24h de sedimentación, se realizaron las siguientes acciones con cada cilindro:

- Eliminar el sobrenadante de tampón de empaquetado utilizando una pipeta limpia, con cuidado para no eliminar/coger resina.
- Añadir el tampón de almacenamiento hasta alcanzar aproximadamente el mismo volumen de slurry que tenía la probeta previamente con el tampón de empaquetado.

- Cerrar cada probeta con film para evitar evaporación. Re-suspender la resina y empezar a contar el tiempo de sedimentación.
- Dejar sedimentar 24 horas. No mover las probetas durante este tiempo. Cada operador registrará las medidas del volumen de resina.

Aquellas probetas con resinas que tarden más de 4 horas (4-24h) en sedimentar, deben ser llevadas a centrífuga. Este tiempo será el equivalente a efectuar en planta, por tanto valores muy altos harían prolongar en el tiempo el proceso.

Se obtienen los siguientes resultados (Tabla 3), clasificados en las siguientes tablas según resina. Se han ajustado los datos de los dos operarios en un único valor, ya que eran iguales para todos los cilindros de las resinas:

Tabla 3: Resultados obtenidos para cada una de las resinas

		Resina 1				
		Cilindro 1	Cilindro 2	Cilindro 3	Cilindro 4	Cilindro 5
Tiempo de sedimentación	30 min	56.0	59.0	62.0	68.0	68.0
	60 min	41.0	43.0	45.0	47.0	50.0
	90 min	41.0	43.0	45.0	47.0	50.0
	120 min	41.0	43.0	45.0	47.0	50.0
	150 min	39.0	43.0	45.0	47.0	50.0
	180 min	39.0	43.0	45.0	47.0	49.0
	210 min	39.0	43.0	45.0	47.0	49.0
	240 min	39.0	43.0	45.0	47.0	49.0
	270 min	39.0	43.0	45.0	47.0	49.0
	24 h	39.0	43.0	45.0	47.0	49.0
Cilindros con tampón de almacenamiento	(Volumen total slurry)	95.0	94.0	93.5	96.0	95.0
	Volumen de resina a las 24 h	40.0	42.0	43.0	47.0	49.0
Exactitud (% de diferencia)		2.56	2.32	4.44	0.0	0.0
		1.86 %				

		Resina 2				
		Cilindr o 1	Cilindr o 2	Cilindr o 3	Cilindr o 4	Cilindr o 5
Tiempo de sedimentación	30 min	39.0	47.0	50.0	59.0	58.0
	60 min	38.0	46.0	46.0	52.0	54.0
	90 min	38.0	46.0	46.0	50.0	54.0
	120 min	38.0	46.0	46.0	50.0	54.0
	150 min	38.0	46.0	46.0	49.5	54.0
	180 min	38.0	46.0	46.0	49.5	54.0
	210 min	38.0	46.0	46.0	49.5	54.0
	240 min	38.0	46.0	46.0	49.5	54.0
	270 min	38.0	46.0	46.0	49.5	53.5
	24 h	37.0	46.0	46.0	49.5	53.5
Cilindros con tampón de almacenamiento	(Volumen total slurry)	92.5	100.0	99.0	100.0	100.0
	Volumen de resina a las 24 h	39.0	41.0	47.0	52.0	53.5
Exactitud (% de diferencia)		5.4	10.8	2.17	5.0	0.0
		4.7 %				

		Resina 3				
		Cilindr o 1	Cilindr o 2	Cilindr o 3	Cilindr o 4	Cilindr o 5
Tiempo de sedimentación	30 min	79.0	79.0	82.5	81.0	97.5
	60 min	76.5	77.0	80.0	79.0	95.5
	90 min	73.0	74.5	77.0	76.5	93.5
	120 min	71.0	72.5	75.0	74.0	91.5
	150 min	68.0	70.0	73.0	72.0	90.0
	180 min	65.0	68.0	71.0	70.0	88.0
	210 min	63.0	65.0	68.5	68.0	83.0
	240 min	60.0	63.0	65.5	65.0	81.5
	270 min	57.0	60.0	63.0	60.5	79.0
	24 h	33.0	36.0	39.0	40.0	50.0
Cilindros con tampón de almacenamiento	(Volumen total slurry)	82.5	82.5	86.5	84.0	100.0
	Volumen de resina a las 24 h	38.0	41.0	44.0	45.5	57.5
Exactitud (% de diferencia)		15.15	13.88	12.82	13.0	15.0
		13.99 %				

INFORME DE RESULTADOS Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

En este experimento se valoran dos factores:

1. Tiempo de sedimentación:

Encontrar el tiempo mínimo de sedimentación para cada cilindro con el tampón de empaquetado (Tabla 4). Para esto, se observa el tiempo al cual el valor de volumen de resina es constante o estable. (Marcado en amarillo en las tablas recogidas en la Tabla 3). El tiempo mínimo de sedimentación debería ser ≤ 240 min.

Tabla 4: Tiempo mínimo de decantación de cada resina

RESINA	TIEMPO MÍNIMO DE DECANTACIÓN
Resina 1	210 minutos
Resina 2	210 minutos
Resina 3	24 horas

2. Exactitud

La exactitud mide el máximo efecto de contracción o expansión que pueda producir la resina por el cambio de tampón de empaquetado a tampón de almacenamiento. Esto es debido a que una vez que se está empaquetando la columna se utiliza el tampón de empaquetado y, en cuanto este proceso termina, la resina quedará en tampón de almacenamiento durante todo el proceso de purificación.

Este valor se calcula mediante un porcentaje de diferencia:

$$\% \text{ diferencia} = \left(\frac{\text{Volumen resina sedimentada en tampón empaquetado} - \text{vol. resina sedimentada en tampón de almacenamiento 24h}}{\text{Vol. resina empaquetado 24h}} \right) * 100$$

Esta diferencia ha de dar un valor ≤ 2 .

CONCLUSIONES:

A la vista de los resultados, puede concluirse:

- Para la Resina 1 los criterios de aceptación se cumplen ya que su tiempo de sedimentación es relativamente bajo y los porcentajes de diferencias, menos al 2%.
- En el caso de la resina 2 y 3, esto no se cumple:
 - Para la resina 2, no se cumple el criterio de aceptación de exactitud al ser mayor de 2%.
 - Para la resina 3, el tiempo de sedimentación se excede del esperado (24 horas), además de que se obtuvo una diferencia del 14%.

Se procede, entonces, a llevar a cabo el segundo método o método de centrifugación.

2. MÉTODO CENTRIFUGA

Determinación de la correlación entre la concentración de resina (V/V) y (W/V).

Definición y resultados.

INTRODUCCIÓN

El método de filtración por centrifugación utiliza la fuerza centrífuga para eliminar el líquido de la muestra de suspensión de slurry, obteniendo así la resina seca. Basado en el peso de resina seca, se calcula la concentración de slurry (W/V).

De esta manera, y empleando la concentración de resina volumen/volumen (determinada por el método de sedimentación por gravedad en probeta) y la concentración de resina peso/volumen (determinada a través de la filtración por centrifugación), puede establecerse una correlación entre ambas mediante una ecuación de la recta.

Método de filtración por gravedad:

Para cada resina teníamos cinco probetas, cada una a una concentración. Para este método necesitaremos dos tubos por operador para añadir el factor humano de pipeteo

(recordemos que se necesitan tres operadores para este método). Por tanto, seis tubos de centrífuga por probeta de resina, esto es, treinta tubos de centrífuga en total para cada resina.

Se enumeran los diez tubos para cada resina y del laboratorio, nos trasladamos a planta. Vamos a llevar a cabo el experimento con las condiciones que se llevarían en planta a la hora de empaquetar.

Primero, se procede a pesar los tubos de centrífuga sin filtro y se anota cada valor. Esto se utilizará posteriormente para obtener el valor de la resina seca. (Si se resta el valor del peso del tubo centrifugado menos el valor del tubo vacío, obtendremos el valor de resina seca para cada uno de los tubos).

Una vez obtenido estos valores, se procede a pipetear 10 mL en cada tubo de centrífuga según corresponda resina, concentración y operador. Para esto, se resuspende primero el slurry de cada probeta y se pipetea 10 mL de la misma rápidamente en el correspondiente tubo. Los tubos se cierran y se introducen en la centrífuga, asegurando su disposición y equilibrio.

Los tubos son centrifugados a una velocidad de 4230 rpm durante 20 minutos.

Una vez haya acabado la centrífuga, se quitan los filtros de los tubos secos para evitar cualquier gota que estuviera en la superficie. Se pesa el filtro conteniendo la resina seca y se lleva a cabo el cálculo de la concentración de slurry peso/volumen.

INFORME DE RESULTADOS Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

Una vez realizado el experimento, se tienen en cuenta los siguientes factores:

1. Variabilidad entre réplicas:

Para el resultado de las réplicas de la concentración de resina (W/V) de cada probeta, las diferencias entre el valor más alto y más bajo debe ser igual o menor al 2.0%. Si es mayor, el protocolo debería repetirse hasta alcanzarlo.

2. Media ajustada para la línea de regresión

Obtener la línea de regresión a partir de un gráfico Excel, donde se enfrenta la media de datos provenientes de la concentración V/V de cada probeta por sedimentación y la media de resultados de concentración W/V.

El resultado de concentración V/V de cada probeta (método de sedimentación), representado contra la media de concentraciones (W/V) debería ajustarse a una línea de regresión $R^2 \geq 0.95$.

Resina 1:

Los datos obtenidos del método de centrífuga se recogen en la siguiente la tabla 5:

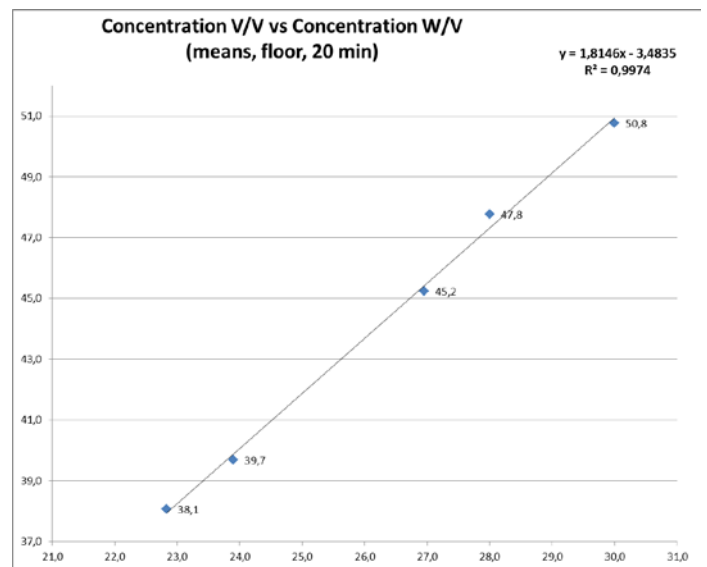
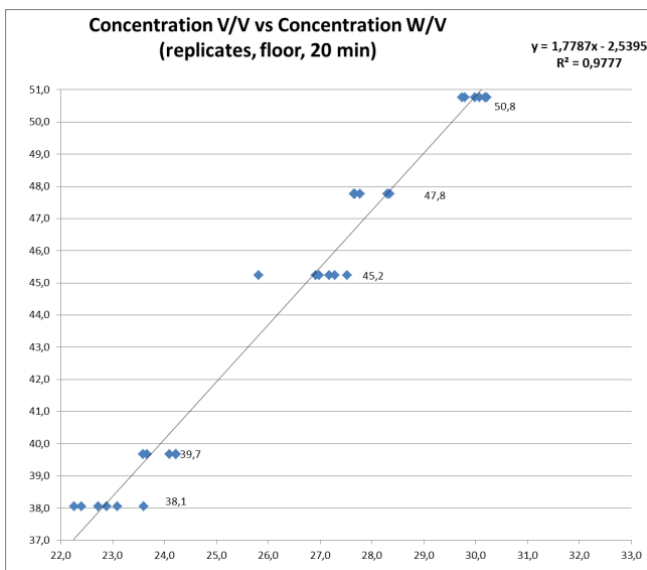
Tabla 5: Resina 1

Cilindro	Operador	Peso del filtro vacío (g)	peso de resina seca + filtro (g)	% Resina (W/V)	Media de % resina	Variabilidad de las muestras
1 (40.0%)	Operador I	4,3537	6,6418	22,8817	22,80	0,2%
		4,4225	6,6951	22,7262		
	Operador II	4,3897	6,6153	22,2558	22,93	
		4,4311	6,7906	23,5955		
	Operador III	4,3816	6,6904	23,0875	22,75	
		4,3869	6,6273	22,4040		
2 (42.5%)	Operador I	4,4125	6,8218	24,0925	24,15	0,6%
		4,4312	6,8527	24,2153		
	Operador II	4,3876	6,7540	23,6645	23,99	
		4,3478	6,7703	24,2245		
	Operador III	4,4289	6,7883	23,5932	23,59	
		4,4356	6,7946	23,5896		
3 (45.0%)	Operador I	4,3813	7,0988	27,1749	27,23	0,6%
		4,4093	7,1380	27,2871		
	Operador II	4,4349	7,1268	26,9296	26,95	
		4,4434	7,1418	26,9835		
	Operador III	4,4269	7,0089	25,8199	26,67	
		4,4298	7,1820	27,5221		
4 (47.5%)	Operador I	4,39440	7,22878	28,3438	28,32	0,6%
		4,40935	7,23938	28,3003		
	Operador II	4,42109	7,18578	27,6469	27,97	
		4,43161	7,26117	28,2956		
	Operador III	4,38355	7,15052	27,6697	27,72	
		4,42440	7,20092	27,7652		
5 (50.0%)	Operador I	4,3834	7,3903	30,0683	30,12	0,4%
		4,4220	7,4397	30,1768		
	Operador II	4,4108	7,4097	29,9884	30,10	
		4,3870	7,4078	30,208		
	Operador III	4,3875	7,3664	29,7897	29,76	
		4,4221	7,3960	29,7396		

- La resta entre resultados extremos de las muestras, expresado como porcentaje del valor más bajo es $\leq 2\%$.
- La correlación de la recta tiene que ser $R^2 \geq 0,9$

Con los datos obtenidos para la Resina 1 (Tabla 5), se ha llevado a cabo la gráfica 1 de donde extraemos $R^2 \geq 0,9$.

Por lo tanto, ambas premisas se cumplen.



Gráfica 1: Gráficos de regresión obtenidos para la resina 1.

Para la resina 1, resina empleada en cromatografía de intercambio catiónico, podemos concluir que mediante los métodos de sedimentación y centrifugación, se puede determinar la concentración de la resina para llevar a cabo un buen empaquetado de la misma de manera correcta y con cierta exactitud.

Resina 2:

Los datos obtenidos del método de centrífuga se recogen en la Tabla 6:

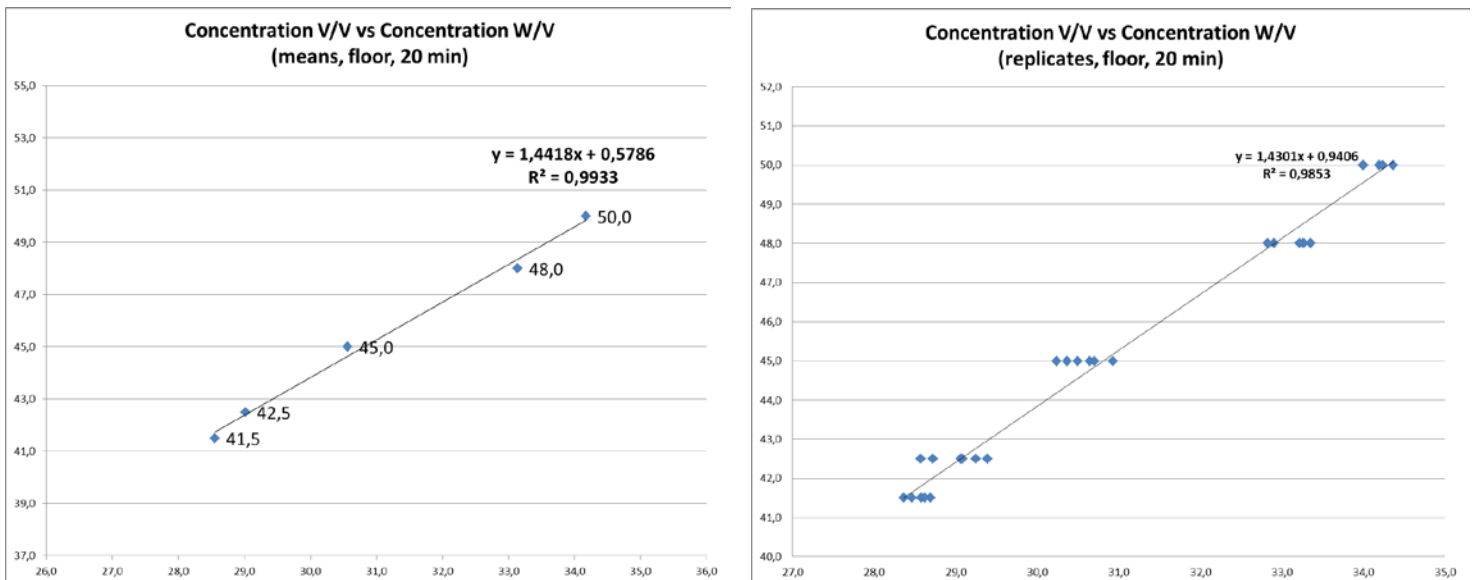
Tabla 6: Resina 2

Cilindro	Operador	Peso del filtro vacío (g)	peso de resina seca + filtro (g)	% Resina (W/V)	Media de % resina	Variabilidad de las muestras
1 (40.0%)	Operador I	4,34667	7,19350	28,5	28,6	0,3%
		4,42322	7,28102	28,6		
	Operador II	4,38678	7,22335	28,4		
		4,38324	7,24132	28,6		
	Operador III	4,39689	7,26656	28,7		
		4,38770	7,25001	28,6		
2 (42.5%)	Operador I	4,36129	7,30021	29,4	29	0,8%
		4,34857	7,20596	28,6		
	Operador II	4,41430	7,32056	29,1		
		4,39907	7,27160	28,7		
	Operador III	4,38763	7,31271	29,3		
		4,34699	7,25552	29,1		
3 (45.0%)	Operador I	4,38094	7,44521	30,6	30,6	0,7%
		4,36293	7,38682	30,2		
	Operador II	4,39413	7,44351	30,5		
		4,40348	7,47350	30,7		
	Operador III	4,39859	7,49191	30,9		
		4,34915	7,38599	30,4		
4 (47.5%)	Operador I	4,39545	7,68567	32,9	33,1	0,5%
		4,40463	7,74011	33,4		
	Operador II	4,40476	7,73115	33,3		
		4,38750	7,71388	33,3		
	Operador III	4,34216	7,62439	33,8		
		4,42090	7,74276	33,2		
5 (50.0%)	Operador I	4,39677	7,79675	34	34,2	0,4%
		4,34224	7,76163	34,2		
	Operador II	4,38830	7,78774	34		
		4,38999	7,81340	34,2		
	Operador III	4,39648	7,83287	34,2		
		4,39015	7,81344	34,2		

- La resta entre resultados extremos de las muestras, expresado como porcentaje del valor más bajo es $\leq 2\%$.
- La correlación de la recta tiene que ser $R^2 \geq 0,9$

Con los datos obtenidos para la Resina 2 (Tabla 6), se ha llevado a cabo la gráfica 2 de donde extraemos $R^2 \geq 0,9$.

Por lo tanto, ambas premisas se cumplen.



Gráfica 2: Gráficos de regresión obtenidos para la resina 2.

Para la resina 2, resina empleada en cromatografía de intercambio aniónico, podemos concluir que mediante los métodos de sedimentación y centrifugación, se puede determinar la concentración de la resina para llevar a cabo un buen empaquetado de la misma de manera correcta y con cierta exactitud.

Para esta resina, representa un avance y un cambio de método respecto al método empleado hasta el momento de PD-10.

Resina 3:

Los datos obtenidos tras llevar a cabo el método de centrífuga se recogen en la Tabla 7:

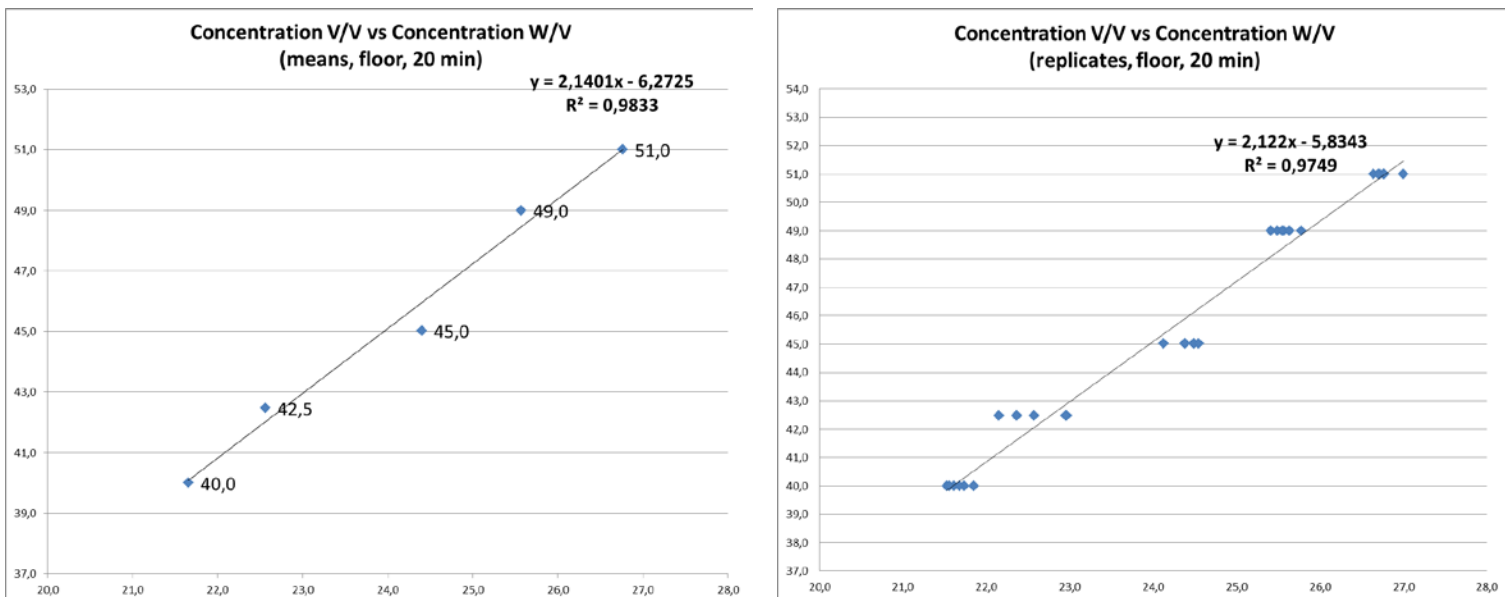
Tabla 7: Resina 3

Cilindro	Operador	Peso del filtro vacío (g)	peso de resina seca + filtro (g)	% Resina (W/V)	Media de % resina	Variabilidad de las muestras
1 (40.0%)	Operador I	4,39601	6,54904	21,5	21,7	0,3%
		4,39926	6,56049	21,6		
	Operador II	4,34983	6,53470	21,8		
		4,42308	6,59655	21,7		
	Operador III	4,39251	6,56016	21,7		
		4,38956	6,54498	21,6		
2 (42.5%)	Operador I	4,39298	6,62979	22,4	22,6	0,8%
		4,38776	6,68451	23,0		
	Operador II	4,41868	6,67573	22,6		
		4,38944	6,60475	22,2		
	Operador III	4,35487	6,65023	23,0		
		4,41909	6,65552	22,4		
3 (45.0%)	Operador I	4,4212	6,8335	24,1	24,4	0,4%
		4,3983	6,8472	24,5		
	Operador II	4,4071	6,8455	24,4		
		4,4071	6,8558	24,5		
	Operador III	4,3857	6,8404	24,5		
		4,4098	6,8481	24,4		
4 (47.5%)	Operador I	4,3977	6,9543	25,6	25,6	0,4%
		4,3878	6,9365	25,5		
	Operador II	4,4235	6,9647	25,4		
		4,3392	6,8937	25,5		
	Operador III	4,3576	6,9353	25,8		
		4,4519	7,0150	25,6		
5 (50.0%)	Operador I	4,42307	7,09958	26,8	26,8	0,4%
		4,33709	7,03710	27,0		
	Operador II	4,41001	7,07437	26,6		
		4,35053	7,02222	26,7		
	Operador III	4,34513	7,02207	26,8		
		4,36073	7,03063	26,7		

- La resta entre resultados extremos de las muestras, expresado como porcentaje del valor más bajo es $\leq 2\%$.
- La correlación de la recta tiene que ser $R^2 \geq 0,9$

Con los datos obtenidos para la Resina 3 (Tabla 7), se ha llevado a cabo la gráfica 3 de donde extraemos $R^2 \geq 0,9$.

Por lo tanto, ambas premisas se cumplen.



Gráfica 3: Gráficos de regresión obtenidos para la resina 3.

Para la resina 3, resina empleada en cromatografía de interacción hidrofóbica, podemos concluir que mediante los métodos de sedimentación y centrifugación, se puede determinar la concentración de la resina para llevar a cabo un buen empaquetado de la misma de manera correcta y con cierta exactitud, por lo tanto se descartaría el uso del método de PD-10 y se sustituye por este nuevo método.

Esta resina presenta la dificultad que, debido a su naturaleza hidrofóbica, sus tiempos de sedimentación son más largos. Durante los experimentos llevados a cabo, se procedió a modificar el protocolo mediante la ampliación del tiempo de sedimentación de 24 horas/1 día hasta 3 días, para así poder ver el momento donde esta resina decantaría y se estabilizaría.

CONCLUSIONES:

De los experimentos llevados a cabo durante la duración de trabajo se concluye que los resultados tras la realización de los dos métodos: Método de sedimentación y Método de centrifugación, son positivos.

Se abre un nuevo camino que dará lugar al cambio de método a la hora de determinar la concentración de la resina con el objetivo de un empaquetado óptimo y correcto en planta. Se deja atrás el método de PD-10, no siempre fiable, y se sustituye por estos nuevos datos obtenidos en base a este estudio.

En el tiempo posterior a la presentación de este estudio, se procederá al cambio en los protocolos de operaciones de empaquetado y se añadirá estos nuevos datos, siempre con supervisión del cliente del producto en cuestión.

Esto se lleva a cabo mediante la introducción de la correlación de la recta obtenida para cada resina en los protocolos de empaquetado, que se siguen en planta. Mediante esta ecuación, se le permite al operario efectuar los cálculos de concentración de resina, para así hallar el volumen de slurry y de esta manera, obtener un empaquetado correcto y un proceso de cromatografía con un alto rendimiento.

BIBLIOGRAFÍA:



¹ Gema Ruiz (FUAM), María Moreno (FUAM), Marta López (Red FUE), Miguel Vega (Genoma España). Informe de vigilancia tecnológica. Anticuerpos monoclonales terapéuticos. Diciembre 2007.

² A.García Merino, Servicio de Neurología/Neuroinmunología. Hospital Puerta del Hierro, Majadahonda. (Junio 2011). Madrid. Anticuerpos Monoclonales. Aspectos básicos. Elsevier. Vol 26. Núm. 05.

³ Terapias dirigidas:

<http://chemocare.com/es/chemotherapy/what-is-chemotherapy/terapia-dirigida>

⁴ U.S. Department of Health and Human Services. (2010). National Cancer Institute USA. <http://www.cancer.gov>

⁵ Sang Jick Kim, Youngwoo Park and Hyo Jeong Hong. (2005). Antibody Engineering for the Development of Therapeutic Antibodies. Laboratory of Antibody Engineering, Korea. Molecules and Cells, Vol. 20, No. 1, pp.17-29.

⁶ Material procedente de Lonza Biologics Porriño®

⁷ GE Healthcare Handbook. (2010). Strategies for Protein Purification. General Electric Company. 28-9833-31 AA.

⁸ Anna Grönberg, Elin Monié, Maria Murby. A Strategy for developing a Monoclonal Antibody Purification Platform. January 2007. Bioprocess International.

⁹ Feng Li, Joe X. Zhou, Xiaoming Yang et al. (2005). Current Therapeutic Antibody Production and Process Optimization. Bioprocessing Journal. Vol.4, Núm. 5.

¹⁰ John R. Bich, Andrew J. Racher. (2006). Antibody Production. Lonza Biologics plc, 228 Bath Road, Slough. Elsevier. Advanced drugs Delivery Reviews 58 671-685.

¹¹ Protein Purification. (1999). Amersham Pharmacia Biotech AB. Uppsala, Sweden (Extraído como manual de GE)

¹² Rodríguez Miranda, J.D. (1991). Cap. 8: Cromatografía. Técnicas de bioquímica y biología molecular. Editorial Reverté. ISBN: 8429118195.

¹³ Stella Torres de Young. Glosario de los términos más usados en cromatografía. Introducción a la Cromatografía. Ediciones de la Univ. Nacional de Colombia. ISBN: 9581701192.

¹⁴ Balley, J. Ollis, D. (1986). Biochemical Engineering Fundamentals. McGraw-Hill Chemical Engineering. New York.

¹⁵ Nikolai Sharapin. (2000). Fundamentos de tecnología. Editorial Convenio Andrés Bello. ISBN: 9586980014. Pág. 159-190.1

¹⁶ Hydrophobic Interaction Chromatography. Principles and methods. (1999). Amersham Pharmacia Biotech AB. Uppsala, Sweden (Extraído como manual de GE). ISBN 91-970490-4-2

¹⁷ Kärnsnas Per. (1992). Chromatography, Hydrophobic interaction. Göteborg, Sweden. Págs 602-611

¹⁸ GE Healthcare. (2007). Phenyl Sepahorse High Performance. Hydrophobic interaction chromatography. 18-1172-87 AC.

¹⁹ Lothar Jacob and Hartmut Schlüter. (2006). Ion Exchange Chromatography for the Purification of Monoclonal Antibodies (MAbs). Bioprocessing and Biopartnering.

²⁰ Andy Masters. (2012). Types of Ion Exchange Chromatography Media. Ge healthcare.

²¹ Connell-Crowley Lisa, Nguyen Thao et al. (2011). Cation Exchange Chromatography Provides Effective Retrovirus Clearance for Antibody Purification

Processes. Biosafety Development Laboratory, Amgen Inc. Washington. Biotechnology and bioengineering.

²² Rathore Anurag, Kennedy Robert et al. (2003). Qualification of a Chromatographic Column. Why and How to Do it. Biopharm International. Pág 30-40.

²³ Larson Tina, Davis Jeff, Lam Harry and Cacia Jerry. (2003). Use of Process Data to Assess Chromatographic Performance in Production-Scale Protein Purification Columns. Manufacturing Science and Technology, Genentech Inc. California. Biotechnology Prog, 19, 485-492.

²⁴ Hui-Chung Cheng Josephine. (2009). Packing and Quality Control of a Chromatography Column. Asia Technology and Training Center Merck Ltd. Taiwan.

Gráficas e ilustraciones:

-  **Figura 1, 3, 4 :** Extraída de informe de vigilancia tecnológica ¹
-  **Figura 2, 5:** Extraída de web: <http://www.cancer.gov> ⁴
-  **Figura 6:** Lonza Biologics Porriño
-  **Figura 7:** Extraído del manual GE Healthcare ⁷
-  **Figura 8, 9:** Extraído del artículo ⁹
-  **Figura 10:** Extraído del manual Protein Purification ¹¹
-  **Figura 11:** Cromatografía definiciones y tipos. Web:
<http://es.slideshare.net/ferccmx1/cromatografia-definiciones-y-tipos>
-  **Figura 12:** Fase móvil y estacionaria. Web:
<https://biokipedia.wikispaces.com/Determinacion+de+Hemoglobina+Glicosilada>
-  **Figura 13:** Extraído de HIC, Principles and methods. ¹⁶
-  **Figura 14 y 15:** Extraída de Types of Ion Exchange. ²⁰
-  **Figura 16:** Column testing HETP web <http://www.gehealthcare.com/>
-  **Figura 17:** Empaquetado a gran escala. Foto de archivos de Lonza®
-  **Figura 18:** web GE healthcare <http://www.gehealthcare.com/>
-  **Figura 19:** Skid de empaquetado <http://www.gehealthcare.com/>
-  **Figura 20:** Imagen de PD-10. Foto de archivo Lonza®
-  **Figura 21:** Imagen extraída de Millipore: <http://www.millipore.com>
-  **Figura 22:** Imagen de probetas tomada durante el experimento en el laboratorio de Lonza®.

